

METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACID AMPLIFIED PRODUCT THROUGH MEASURING OPTICAL PROPERTY

Publication number: JP2002186481 (A)

Publication date: 2002-07-02

Inventor(s): MORI YASUYOSHI; TOMITA NORIHIRO

Applicant(s): EIKEN CHEMICAL

Classification:

- international: C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N15/09; C12Q1/68

- European:

Application number: JP20000383650 20001218

Priority number(s): JP20000383650 20001218

Abstract of JP 2002186481 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for detecting a nucleic acid amplified product more simply than ever. **SOLUTION:** This method for detecting a nucleic acid amplified product comprises the steps of transmitting a polarized light through the reaction liquid in nucleic acid amplification reaction and measuring the optical properties of the polarized light.

Data supplied from the *esp@cenet* database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-186481
(P2002-186481A)

(43) 公開日 平成14年7月2日(2002.7.2)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	キーワード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2000-383650(P2000-383650)

(22) 出願日 平成12年12月18日(2000.12.18)

(71) 出願人 000120456

栄研化学株式会社
東京都文京区本郷1丁目33番8号

(72) 発明者 森 安義

栃木県大田原市下石上1381-3 栄研化学
株式会社那須工場内

(72) 発明者 富田 意弘

栃木県大田原市下石上1381-3 栄研化学
株式会社那須工場内

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

Fターム(参考) 4B024 AA20 HA11

4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ52
QR08 QR62 QS25 QX01

(54) 【発明の名称】 光学的特性の測定による核酸増幅産物の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 光学的特性の測定による核酸増幅産物の検出
方法の提供。

【解決手段】 核酸増幅反応における反応液に偏光を通
過させ、その偏光の光学的特性を測定することによる核
酸増幅産物検出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸増幅反応における反応液に偏光を通過させ、その偏光の旋光度または円偏光二色性を測定することによる核酸増幅産物検出方法。

【請求項2】 核酸増幅反応における反応液を熱変性させ、熱変性に基づく該反応液の旋光度または円偏光二色性の変化を指標とする核酸増幅産物検出方法。

【請求項3】 核酸増幅反応が、以下の工程：

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c及び第2の任意配列F2cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第3の任意配列R1及び第4の任意配列R2をそれぞれ選択し、

(b) 前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、並びに前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマーをそれぞれ調製し、

(c) 前記ヌクレオチド鎖を鋳型として、鎖置換型ポリメラーゼ及び前記プライマーの存在下でDNA合成反応を行うこと、により行われるものである請求項1又は2に記載の核酸増幅産物検出方法。

【請求項4】 核酸増幅反応が、以下の工程：

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c、第2の任意配列F2c及び第3の任意配列F3cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第4の任意配列R1、第5の任意配列R2及び第6の任意配列R3をそれぞれ選択し、

(b) 前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、前記F3cに対し相補的な配列F3を含むプライマー、前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマー、並びに前記R3と同一の配列を含むプライマーをそれぞれ調製し、

(c) 前記ヌクレオチド鎖を鋳型として、鎖置換型ポリメラーゼ及び前記プライマーの存在下でDNA合成反応を行うこと、により行われるものである請求項1又は2に記載の核酸増幅産物検出方法。

【請求項5】 核酸増幅反応における反応液に偏光を通過させ、その偏光の旋光度または円偏光二色性を測定することによる核酸増幅反応の監視方法。

【請求項6】 核酸増幅反応が、以下の工程：

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c及び第2の任意配列F2cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第3の任意配列R1及び第4の任意配列R2をそれぞれ選択し、

(b) 前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、並びに前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマーをそれぞれ調製し、

(c) 前記ヌクレオチド鎖を鋳型として、鎖置換型ポリメラーゼ及び前記プライマーの存在下でDNA合成反応を行うこと、を包含するものである請求項5に記載の核酸増幅反応の監視方法。

【請求項7】 核酸増幅反応が、以下の工程：

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c、第2の任意配列F2c及び第3の任意配列F3cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第4の任意配列R1、第5の任意配列R2及び第6の任意配列R3をそれぞれ選択し、

(b) 前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、前記F3cに対し相補的な配列F3を含むプライマー、前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマー、並びに前記R3と同一の配列を含むプライマーをそれぞれ調製し、

(c) 前記ヌクレオチド鎖を鋳型として、鎖置換型ポリメラーゼ及び前記プライマーの存在下でDNA合成反応を行うこと、を包含するものである請求項5に記載の核酸増幅反応の監視方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸増幅産物の検出方法、並びに核酸増幅反応の監視方法に関する。

【0002】

【従来の技術】核酸増幅反応によって得られた核酸増幅産物を検出する最も一般的な方法は、増幅反応後の溶液をアガロースゲル電気泳動にかけ、エチジウムブロマイド等の蛍光インターカレーターを結合させて特異的な蛍光を観察するというものである。他のDNAが混在するおそれがなく、増幅産物の有無のみを知りたい場合には、電気泳動を省略して増幅反応後の溶液に蛍光インターカレーターを加えて蛍光を観察することも可能であるが、これらの方法は、蛍光を観察するためのUVランプと暗室が必要である。それ以外にも、蛍光色素をはじめとする各種標識物質で標識したプライマーやヌクレオチドを用いて増幅反応を行い、増幅産物に取り込まれた標識を観察する方法もあるが、増幅産物に取り込まれなかったフリーの標識プライマー（あるいはヌクレオチド）を分離する操作が必要であり、反応液量が微量である核酸増幅反応には適さない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、より簡便な核酸増幅産物の検出方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、核酸増幅反応液を通過した平面偏光の光学的特性が、通過前後で変化することを見出し、該光学的特性を指標として高感度に核酸増幅産物を検出し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は、核酸増幅反応における反応液に偏光を通過させ、その偏光の旋光度または円偏光二色性を測定することによる核酸増幅産物検出方法又は核酸増幅反応の監視方法である。また、本発明は、核酸増幅反応における反応液を熱変性させ、熱変性に基づく該反応液の旋光度または円偏光二色性の変化を指標とした核酸増幅産物検出方法である。

【0006】核酸増幅反応としては、以下の工程：

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c及び第2の任意配列F2cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第3の任意配列R1及び第4の任意配列R2をそれぞれ選択し、(b) 前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、並びに前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマーをそれぞれ調製し、(c) 前記ヌクレオチド鎖を鋳型として、鎖置換型ポリメラーゼ及び前記プライマーの存在下でDNA合成反応を行うこと、を包含するものが挙げられる。

【0007】さらに、核酸増幅反応としては、以下の工程：

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c、第2の任意配列F2c及び第3の任意配列F3cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第4の任意配列R1、第5の任意配列R2及び第6の任意配列R3をそれぞれ選択し、(b) 前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、前記F3cに対し相補的な配列F3を含むプライマー、前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマー、並びに前記R3と同一の配列を含むプライマーをそれぞれ調製し、(c) 前記ヌクレオチド鎖を鋳型として、鎖置換型ポリメラーゼ及び前記プライマーの存在下でDNA合成反応を行うこと、を包含するものも挙げられる。上記増幅法をLAMP法という。LAMP法とは、DNALूप媒介等温増幅法 (Loop-mediated isothermal amplification) と呼ばれる増幅法である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明は、ポリヌクレオチド鎖上の標的領域を増幅した後、増幅反応に伴い変化する光学

的特性（例えば、旋光度、円偏光二色性等）を指標として核酸増幅産物を検出することの特徴とするものである。

1. 光学的特性の測定による増幅産物の検出

核酸増幅反応における反応液に平面偏光を通過させ、その偏光の光学的特性を測定することによって核酸増幅産物を検出することができる。ここで、光学的特性としては、旋光度、円偏光二色性、偏光を構成する各成分の屈折率、吸収等が挙げられる。旋光とは平面偏光を構成する右円偏光と左円偏光の速度の差（屈折率差）であり、偏光面の回転として観察される。旋光度とは、(1) 光学活性化合物あるいはそれを含む溶液に平面偏光を通過させたとき、その偏光面が回転する角度のこと、あるいは、(2) 入射光と同一平面で偏光している光の光量の減少割合、あるいは、(3) 入射光の偏光面とは任意の角度で偏光している光の光量の増加割合を意味する。また、旋光度は、波長λの単色偏光を用いて温度t℃で測定したときの旋光度を意味する。また、円偏光二色性とは、平面偏光を構成する右円偏光と左円偏光の吸収の違いのことであり、楕円率θで表される。旋光度は旋光計を用いて、円偏光二色性は円偏光二色性測定機を用いて測定することができる。旋光計及び円偏光二色性測定機はいずれも市販されており、市販の旋光計としては、SEPA-300（堀場製作所社製）、Shodex OR-2（昭和電工社製）等が挙げられ、市販の円偏光二色性測定機としては、J-805（日本分光社製）等が挙げられる。

【0009】具体的には、反応液の光学的特性を指標として、該反応液について以下のように評価することができる。増幅反応の反応液の旋光度が、増幅反応前に比べ増幅反応後の方が増加していれば、増幅産物が反応液中に生成されていると評価することができ、増加していなければ反応液中に増幅産物は生成されていないと評価することができる。ここで、その増大の割合は、反応液中に生成されている増幅産物の量及び長さとの正の相関性がある。また、増幅反応の反応液の円偏光二色性が、増幅反応前に比べ増幅反応後の方が増加していれば、増幅産物が反応液中に生成されていると評価することができ、増加していなければ反応液中に増幅産物は生成されていないと評価することができる。ここで、例えば245nmで反応液の円偏光二色性を測定した場合には、増幅産物が生成されていれば負の方向に円偏光二色性は増大し、275nmで反応液の円偏光二色性を測定した場合には、増幅産物が生成されていれば正の方向に円偏光二色性は増大する。さらに、増幅反応後の反応液を熱等で変性処理し、変性処理前よりも変性処理後の方が、旋光度が減少していれば、増幅産物が反応液中に生成されていると評価することができ、減少していなければ反応液中に増幅産物は生成されていないと評価することができる。また、二本鎖核酸の一本鎖核酸への変性にともない旋光度が変化する現象は、その特異的な構造のために二本鎖を

形成しやすいLAMP産物と、他の光学活性成分（鋳型DNA、アミノ酸、タンパク質等）とを区別することや測定するSN比を改良するために利用することができる。

【0010】2. 増幅反応

本発明の検出方法の一態様は、重合度の大きな増幅産物ほど、大きな旋光度を示すという発見に基づいており、従って、本発明の検出方法は、特に長鎖長の増幅産物が得られる増幅反応における増幅産物の検出に適している。そのような増幅反応としては、LAMP法が挙げられる。この他長鎖長の増幅産物が得られるLA(Long and Accurate)-PCR[Barnes, W.M.:Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 2216-2220 (1994)]等を採用することもできる。

【0011】LAMP法は増幅対象となる塩基配列の末端にループ構造を形成し、そこを起点としてポリメラーゼによる伸長反応が起きると同時に、ループ内の領域にハイブリダイズしたプライマーが、鎖置換反応により核酸鎖を伸長しながら先の伸長反応の産物を1本鎖に解離させていくというものである。生成した1本鎖核酸はその末端に自己相補性領域を持つため、末端にループを形成し新たな伸長反応が始まる。実際のLAMP法では等温で進行するため、上に述べた反応は同時に並行して起こる。LAMP法の特徴としては、等温で進行する鎖置換型の反応であることのほかに、増幅産物が標的配列が多数連結した長鎖長のDNAであることが挙げられる。増幅産物が長鎖長であるということは、本発明を適用する核酸増幅法としては好適であることを意味する。

【0012】(1) LAMP法

まず、LAMP法の概要を示す（図1及び図2）。LAMP法において、まず増幅の対象となる鋳型ポリヌクレオチドを調製する。鋳型ポリヌクレオチド（DNA又はRNA）は、組織又は細胞等の生物学的試料から公知方法により、あるいは化学合成法により調製することができる。この場合、増幅の標的領域の両側（標的領域の5'側及び3'側）には、適当な長さの配列（両側配列という）が存在するように鋳型ポリヌクレオチドを調製する（図1A）。両側配列とは、当該標的領域の5'末端からポリヌクレオチド鎖の5'末端までの領域の配列、及び当該標的領域の3'末端からポリヌクレオチド鎖の3'末端までの領域の配列を意味する（図1Aの両矢印（ \longleftrightarrow ）部分）。両側配列の長さは、標的領域の5'側及び3'側のいずれの領域も、10～1000塩基、好ましくは30～500塩基である。

【0013】標的領域及び両側配列を含む鋳型ポリヌクレオチド鎖（図1A）において、両側配列の中から任意に所定の領域を選択する。すなわち、標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって、順に第1の任意配列F1c、第2の任意配列F2c及び第3の任意配列F3cをそれぞれ選択する（図1B）。同様に、標的領域の5'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって、順に第4の任意配列R1、第5の任意配列R2及び第6の任意配列R3をそれぞれ選択する（図1

B）。上記第1～第6の配列は、それぞれ、調製されたポリヌクレオチド鎖の配列に応じて任意に選択される。選択する個々の領域は、それぞれ、5～100塩基が好ましく、10～50塩基がさらに好ましい。この塩基の長さを選択することにより、後述のプライマーがアニールしやすくなる。

【0014】また、各任意配列は、LAMP法により得られる増幅産物が分子間アニールではなく、図2LのようにF1c配列とF1配列との間及びR1配列とR1c配列との間で分子内アニールを優先的に生じ、末端ループ構造を形成するように選択することが好ましい。例えば、分子内アニールを優先的に生じさせるためには、任意配列の選択に当たって、F1c配列とF2c配列との間の距離及びR1配列とR1c配列との間の距離を考慮することが重要である。具体的には、両者各配列が、0～500塩基、好ましくは0～100塩基、最も好ましくは10～70塩基の距離を介して存在するように選択することが好ましい。ここで、数値はそれぞれ、F1c配列及びF2c配列自身並びにR1配列及びR2配列自身を含まない塩基数を示している。

【0015】次に、FAプライマーと呼ばれるプライマーを設計及び合成しておいて、これをF2cにアニールさせる。「FAプライマー」とは、F2c領域に相補的な配列であるF2配列と、F1cと同一の配列（便宜上F1cともいう）とが連結されたものであって、F2の5'側に、F1c配列の3'末端が連結した構造をしたものである（図1C）。また、「アニール」とは、ヌクレオチド鎖が、ワトソン・クリックの法則に基づく塩基対結合によって二本鎖構造を形成することをいう。FAプライマーを鋳型ポリヌクレオチド鎖上のF2c配列にアニールさせた後は、FAプライマー中のF2を起点として、DNA鎖合成を開始させる（図1D）。続いて、F3cに相補的な配列F3を含むプライマー（以下、F3プライマーともいう）を鋳型ポリヌクレオチド鎖のF3c配列にアニールさせる（図1D）。そして、アニールさせたF3プライマーを起点として、鎖置換型DNA鎖合成を行わせる（図1E）。「鎖置換型DNA鎖合成」とは、FAプライマーによって合成された鎖を、F3プライマーによって合成された鎖が置換するように合成が進む反応を意味する。換言すれば、FAプライマーによって合成された、鋳型ポリヌクレオチド鎖の相補鎖は、F3プライマーを起点として伸長した鎖によって剥離されるように置換することを意味する。以上の合成反応によって、以下の(i)及び(ii)の2種類のヌクレオチド鎖を得ることができる。

【0016】(i) 鋳型ポリヌクレオチド鎖中の配列

「(3')F3c-F2c-F1c-標的領域-R1-R2-R3(5')」に対して相補的な配列「(5')F3-F2-F1-標的領域-R1c-R2c-R3c(3')」を含むヌクレオチド鎖（図1F）

(ii) 置換されて一本鎖となった（剥離された）ヌクレオチド鎖、すなわちその5'末端側にF1cと同一の配列を有する「(5')F1c-F2-F1-標的領域-R1c-R2c-R3c(3')」を

含むヌクレオチド鎖 (図1G)

ここで、上記(ii)のヌクレオチド鎖において、F1とF1cとは互いに相補的であるため、F1とF1cとの間の鎖内水素結合によって両者はハイブリダイズし、ヘアピンループが形成される (図1G) そして、ヘアピンループ中にF2が含まれる。

【0017】次に 上記(ii)のヌクレオチド鎖のR2c配列に、「RAプライマー」と呼ばれるプライマーをアニールさせる。RAプライマーは、R2配列の5'側に、R1配列に対して相補的な配列R1cの3'側が連結されている。そして、RAプライマーを合成起点としてDNA鎖合成を開始させる (図1H)。RAプライマーを合成起点として合成された伸長DNAがF1とF1cとの間で形成される相補鎖部分に達すると、図1Eに示す置換反応と同様にしてF1cの配列が当該伸長DNAによって置換される (図1I)。続いて銑型ポリヌクレオチド鎖のR3cに、該配列に相補的な配列R3を含むプライマー (以下、R3プライマーともいう) をアニールさせる (図1I)。アニールさせたR3プライマーを起点として、鎖置換型のDNA合成を行わせる (図2J)。以上の合成反応によって、以下の(iii)及び(iv)の2種類のヌクレオチド鎖が合成される。

【0018】(iii) 配列「(5')F1c-F2-F1-標的領域-R1c-R2c-R3c(3')」に対して相補的なヌクレオチド鎖「(3')F1-F2c-F1c-標的領域-R1-R2-R3(5')」 (図2K)
(iv) 最も3'末端側にF1を、最も5'末端側にR1cを有するヌクレオチド鎖「(3')F1-F2c-F1c-標的領域-R1-R2-R1c(3')」 (図2L)

なお、上記(iv)の配列は、3'側に存在する配列F1とF1cとの間及び5'側に存在する配列R1とR1cとの間の鎖内水素結合によってヘアピンループを形成する (図2L)。

【0019】次に、前記(iv)ヌクレオチド鎖のうち3'側のヘアピンループ部分のF2cにFAプライマーのF2領域をアニールさせる (図2M)。そして、鎖内水素結合によりアニールしているF1を合成起点としてDNA鎖合成を開始させる。図1Mにおいて、F1を起点としてDNAが合成されると、その鎖によってR1とR1cとで形成される2本鎖が置換される。一方、F2を起点として反応が進むと、「F1c-標的領域-R1-R2-R1c」で構成される鎖に対する相補鎖が合成される。このとき、F1を起点として合成された鎖「F1-標的領域-R1c-R2c-R1」は、上記F2を起点として合成された鎖「F1-標的領域-R1c-R2c-R1」によって置換される。これによって、一本鎖突出構造「-標的配列-R1c-R2c-R1」を有する二本鎖DNAが得られる。かかる一本鎖突出構造部は、一本鎖突出構造部分「R1c-R2c-R1」のR1cとR1との間で鎖内水素結合を形成することによってヘアピンループを形成する (図2N)。この構造物は、鎖内水素結合によりアニールしているR1を合成起点としてDNA鎖合成を開始させる (図2N)。以上の合成反応によって、以下の(v)及び(vi)の2種類のヌクレオチド鎖を得る。

【0020】(v) 配列「(3')R1-R2-R1c-標的領域-F1-F2-F1c-標的領域-R1-R2c-R1c-標的領域-F1-F2c-F1c-標的領域-R1-R2-R1c(5')」 (図2O)

(vi) 最も3'末端側にF1cを、最も5'末端側にR1を有する配列「(3')F1c-F2-F1-標的領域-R1c-R2c-R1(3')」 (図2P)

上記(v)及び(vi)のヌクレオチド鎖は、いずれも鎖内水素結合によって、(v)についてはR2c、並びに(vi)についてはF2及びR2cをループ部分とするヘアピンループを形成する。上記(v)及び(vi)の2つの配列においてヘアピンループを形成しているR2c部分にはRAプライマーがアニールし、該プライマーを起点とするDNA合成が開始し、標的配列を含むヌクレオチド鎖 (vi)の配列に対する相補鎖の合成が進む。この相補鎖は図2Lに示す配列と同一であるので、以下、図2L~Pの反応が繰り返される。一方、図1Aからの反応も進行し得るので、これらの一連の合成反応が繰り返されて、ポリヌクレオチド鎖の増幅が進行する。

【0021】上記の増幅反応においては、FAプライマー、RAプライマー、F3プライマー及びR3プライマーの4種類のプライマーを用いて増幅反応を行うものであるが、F3プライマー及びR3プライマーを使用せずに、FAプライマー及びRAプライマーの2種のプライマーのみを使用することによっても、等温下での増幅反応を起こさせることが可能である。すなわち、プライマーは少なくともそれがアニールすべき領域が1本鎖でなければアニールすることはできないと考えられていた。そのため従来は、2本鎖の核酸を銑型とする場合には、プライマーのアニールに先立って必ず変性によって1本鎖とする工程が実施されてきた。しかし必ずしも完全な1本鎖としなくとも、何らかの手段によって2本鎖が不安定化される条件のもとで、プライマーとインキュベートすることにより、プライマーのアニールが可能となる。2本鎖が不安定化される条件としては、たとえば融解温度 (以下、 T_m と省略する) 近くにまで加温する方法を示すことができる。あるいは、更に T_m 調整剤を存在させることも有効である。

【0022】一連の反応は、酵素反応に好適なpHを与える緩衝剤、酵素の触媒活性の維持やアニールのために必要な塩類、酵素の保護剤、更には必要に応じて融解温度 (T_m)の調整剤等の共存下で行う。緩衝剤としては、Tris-HCl等の中性から弱アルカリ性に緩衝作用を持つものが用いられる。pHは使用するDNAポリメラーゼに応じて調整する。塩類としてはKCl、NaCl、あるいは $(NH_4)_2SO_4$ 等が、酵素の活性維持と核酸の融解温度 (T_m)調整のために適宜添加される。酵素の保護剤としては、ウシ血清アルブミンや糖類が利用される。

【0023】更に融解温度 (T_m)の調整剤には、ベタイン、プロリン、ジメチルスルホキシド (以下、DMSOと省略する)、あるいはホルムアミドが一般に利用される。

融解温度(T_m)の調整剤を利用することによって、前記オリゴヌクレオチドのアニールを限られた温度条件の下で調整することができる。更にベタイン(N,N,N,-trimethylglycine)やテトラアルキルアンモニウム塩は、そのisostabilize作用によって鎖置換効率の向上にも有効である。ベタインは、反応液中0.2~3.0 M、好ましくは0.5~1.5 M程度の添加により、本発明の核酸増幅反応の促進作用を期待できる。これらの融解温度の調整剤は、融解温度を下げる方向に作用するので、塩濃度や反応温度等のその他の反応条件を考慮して、適切なストリンジェンシーと反応性を与える条件を経験的に設定する。

【0024】 T_m 調整剤を利用することにより、酵素反応に好適な温度条件を容易に設定することができる。 T_m はプライマーと標的塩基配列の関係によって変動する。したがって、酵素活性を維持できる条件と、本発明の条件を満たすインキュベーションの条件とが一致するように、 T_m 調整剤の使用量を調整することが望ましい。本発明の開示に基づいて、プライマーの塩基配列に応じて適切な T_m 調整剤の使用量を設定することは、当業者にとって自明である。たとえば、アニールする塩基配列の長さとそのGC含量、塩濃度、および T_m 調整剤の濃度に基づいて、 T_m を算出することができる。

【0025】このような条件下における2本鎖の核酸に対するプライマーのアニールは、おそらく不安定であると推測される。しかし鎖置換型のポリメラーゼとともにインキュベートすることにより、不安定ながらアニールしたプライマーを複製起点として相補鎖が合成される。相補鎖が合成されれば、プライマーのアニールは次第に安定化されることになる。

【0026】(2) 反応時間、融解温度との関係
LAMP法における反応は、鎖型となる1本鎖の核酸に対して、以下の成分を加え、FAプライマー及びRAプライマーを構成する塩基配列が相補的な塩基配列に対して安定な塩基対結合を形成することができ、かつ酵素活性を維持しうる温度でインキュベートすることにより進行する。インキュベート温度は50~75℃、好ましくは55~70℃であり、インキュベート時間は1分~10時間、好ましくは5分~4時間である。

【0027】(i) 4種類のオリゴヌクレオチド(FAプライマー、RAプライマー、F3プライマー及びR3プライマー)

(ii) 鎖置換型の相補鎖合成を行うDNAポリメラーゼ

(iii) DNAポリメラーゼの基質となるヌクレオチド

なお、上記LAMP法において使用するFAプライマー及びRAプライマーをインナープライマー、F3プライマー及びR3プライマーをアウタープライマーともいう。

【0028】アウタープライマーからのヌクレオチド鎖合成は、インナープライマーからのヌクレオチド鎖合成よりも後に開始される必要がある。これを達成する方法として、(a)インナープライマーの濃度をアウタープラ

イマーの濃度よりも高く設定する方法、及び(b)インナープライマーの融解温度(T_m :melting temperature)をアウタープライマーの融解温度よりも高く設定する方法などが挙げられる。具体的には、方法(a)は、インナープライマーの濃度をアウタープライマーの濃度よりも、2~50倍、好ましくは4~25倍高く設定することにより実施することができる。また、方法(b)は、式で表わすならば(F_3-F_3c 領域間及び R_3-R_3c 領域間の融解温度) \leq (F_2-F_2c 領域間及び R_2-R_2c 領域間の融解温度) \leq (F_1-F_1c 領域間及び R_1-R_1c 領域間の融解温度)と表すことができる。ここで、(F_2-F_2c 領域間及び R_2-R_2c 領域間の融解温度) \leq (F_1-F_1c 領域間及び R_1-R_1c 領域間の融解温度)としたのは、 F_2 又は R_2 がループ部分にアニールするよりも先に F_1-F_1c 領域間又は R_1-R_1c 領域間のアニールを行わせるためである。 F_1-F_1c 領域間又は R_1-R_1c 領域間のアニールは分子内の反応であるため、優先的に進行する可能性がある。しかし、より望ましい反応条件を設定するために融解温度を考慮することは重要である。あるヌクレオチド鎖と当該ヌクレオチド鎖の相補鎖により形成される二本鎖の融解温度は、当該二本鎖の長さや塩基対合を構成する塩基に組合わせにより理論的に算出することが可能である。

【0029】また、上記鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼ(鎖置換型ポリメラーゼともいう)としては、Bst DNAポリメラーゼ、Bca(exo-)DNAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、Vent DNAポリメラーゼ、Vent(Exo-)DNAポリメラーゼ(Vent DNAポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの)、DeepVent DNAポリメラーゼ、DeepVent(Exo-)DNAポリメラーゼ(DeepVent DNAポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの)、Φ29ファージDNAポリメラーゼ、MS-2ファージDNAポリメラーゼ、Z-Taq DNAポリメラーゼ(宝酒造)、KOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)などが挙げられる。

【0030】増幅反応は、酵素反応に好適なpHを与える緩衝剤、酵素の触媒活性の維持やアニールのために必要な塩類、酵素の保護剤、更には必要に応じて融解温度(T_m)の調整剤等の共存下で行う。緩衝剤としては、Tris-HCl等の中性から弱アルカリ性に緩衝作用を持つものが用いられる。pHは使用するDNAポリメラーゼに応じて調整する。塩類としては $MgCl_2$ 、 KCl 、 $NaCl$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 等が挙げられ、酵素の活性維持と核酸の融解温度(T_m)調整のために適宜添加される。酵素の保護剤としては、ウシ血清アルブミンや糖類が利用される。更に融解温度(T_m)の調整剤には、ジメチルスルホキシド(DMSO)やホルムアミドが一般に利用される。融解温度(T_m)の調整剤を利用することによって、前記オリゴヌクレオチドのアニールを限られた温度条件の下で調整することができる。更にベタイン(N,N,N,-トリメチルグリシン)やテトラアルキルアンモニウム塩は、そのisostabilize作用によって鎖置

換効率の向上にも有効である。ベタインは、反応液中0.2～3.0M、好ましくは0.5～1.5 M程度の添加により、本発明の核酸増幅反応の促進作用を期待できる。これらの融解温度の調整剤は、融解温度を下げる方向に作用するので、塩濃度や反応温度等のその他の反応条件を考慮して、適切なストリンジェンシーと反応性を与える条件を経験的に設定する。

【0031】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例1〕 旋光度及び円偏光二色性スペクトルの測定に基づくLAMP反応増幅産物の検出

【0032】

反応液組成

反応液組成 (25 μ L 中)

20 mM Tris-HCl pH 8.8
10 mM KCl
10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
4 mM MgSO_4
0.8 M ベタイン
1.6 mM dNTP
8 U Bst DNA ポリメラーゼ

【0033】上記反応液中に、LAMP反応の鋳型としてヒト由来前立腺特異抗原 (Prostate Specific Antigen: PSA) 遺伝子を 6×10^{-20} mol量添加した。なお、本増幅反応においては鋳型中に含まれる以下の配列 (配列番号1) を目的ポリヌクレオチドとした。

5'-tgcttggtgcctctcgtggcaggcagctgcggcggtgttctggtgcacccagtggtgctcacagctgccactgcatcaggaacaaaagcgtgatcttgctgggtcgccacagcctgtttcactctgaagacacaggccaggtatttcaggtcagccacagcttcacacaccc-3' (配列番号1)

配列番号1において、標的配列、F1c、F2c、F3c、R1、R2、R3に対応する領域は以下の通りである。

【0034】標的領域：配列番号1に示す塩基配列の第91～102番目 (12bp)

F1c：配列番号1に示す塩基配列の第68～90番目 (23bp)

F2c：配列番号1に示す塩基配列の第26～44番目 (19bp)

F3c：配列番号1に示す塩基配列の第1～18番目 (18bp)

R1：配列番号1に示す塩基配列の第103～122番目 (22bp)

R2：配列番号1に示す塩基配列の第139～161番目 (23bp)

R3：配列番号1に示す塩基配列の第162～178番目 (17bp)

【0035】次いで、以下の配列を有するプライマーを反応液中に入れ65℃で1時間反応させた。

〔プライマー〕

(インナープライマー)

1.6 μ M FAプライマー

5'-tggtcctgatgcagtggtgcagcttagctcgcggcggtgttctg-3'

(配列番号2)

1.6 μ M RAプライマー

5'-tgctgggtcgccacagcctgaagctgacctgaaatacctggcctg-

3' (配列番号3)

(アウトタープライマー)

0.4 μ M F3プライマー

5'-tgcttggtgcctctcgtg-3' (配列番号4)

0.4 μ M R3プライマー

5'-gggtgtgtgaagctgtg-3' (配列番号5)

【0036】(2) LAMP反応増幅産物の検出

LAMP反応前、LAMP反応中及びLAMP反応後の反応液の旋光度を旋光計SEPA-300 (HIRIBA社製) を用い、以下の測定条件下で測定した。また、反応系中のDNA量を蛍光インターカレーター法 (反応系中のDNA量をエチジウムブロマイドによって測定する方法) によって測定した。

【0037】〔旋光度の測定条件〕

測定温度：27℃

セル：100mmセル (2.5ml)

光源：ナトリウムD線 (589nm)

測定結果を表1に示した。反応前のLAMP溶液には、プライマー及びdNTPsという光学活性化合物が含まれるが、濃度が薄いために旋光度測定値は0であった。ところが、LAMP反応が進行し溶液中のDNA量が増大するに従って、旋光度の値が増加した。反応前後では、反応系中の不斉炭素数は変わらないので、旋光度の増加は、dNTPが重合したことに起因する。つまりモノマーのdNTPsよりも、ポリマーのDNAの方が高い旋光性を示すということである。以上より、旋光度を指標として増幅産物を検出することができることが判明した。

【0038】

【表1】

反応ステージ	DNA 量 (μ g/25 μ l)	旋光度 α
LAMP 反応前	0	0.0000
LAMP 反応中	8	0.0300
LAMP 反応後	15	0.0700

【0039】また、LAMP反応前及びLAMP反応後の反応液の円偏光二色性スペクトルを、円偏光二色性測定器J-805 (日本分光社製) を用い測定した。

【0040】測定結果を表2に示した。表2から明らかに、増幅反応の前後で円偏光二色性スペクトルに

差が現れた。すなわち、波長245nmでは負のコットン効果の増大が、波長275nmでは正のコットン効果の増大が観察された。前記のように、反応前後では、反応系中の不斉炭素数は変わらないので、旋光度の増加は、dNTPが重合したことに起因する。以上より、円偏光二色性を指

標として、増幅産物を検出することができることが判明した。

【0041】

【表2】

反応ステージ	各波長における円偏光二色性 (楕円率 mdeg)	
	245nm	275nm
LAMP 反応前	-3.1	5.5
LAMP 反応後	-10.8	10.0

【0042】〔実施例2〕 旋光度に及ぼすDNA重合度の影響

DNAの重合度と旋光度との関係を調べるため、重合度の異なる各化合物の旋光度を測定した。すなわち、dNTPs、43merのオリゴssDNA (配列番号6) LAMP反応増幅産物 (実施例1において得られたもの)、1000bpラダー、

λ-DNAをモノマー単位でいずれも0.4mMの濃度になるように調製し、実施例1と同じ条件下で、各調製物の旋光度を調べた。測定結果を表3に示した。

【0043】

【表3】

化合物	モノマー単位での濃度 (mM)	重合度	旋光度 α
dNTPs	0.4	1	0.0050
オリゴ ssDNA	0.4	43	0.0055
LAMP 反応産物	0.4	数 100~数 1000	0.0120
1000bp ラダー	0.4	1000~15000	0.0160
λ-DNA	0.4	48000	0.0280

【0044】最も重合度の低いdNTPsが最も小さい旋光度を示し、最も重合度の高いλ-DNAが最も高い旋光度を示した。旋光度測定においては、前記のように、全ての測定サンプルはモノマー単位で濃度をそろえてあるため、これらの旋光度の違いは、DNAの重合度の差に起因するものである。すなわち、重合度が高くなるに従って、旋光度の高くなり、このことより、旋光度を指標として重合度を見積もることが可能であることが判明した。

【0045】〔実施例3〕 旋光度に及ぼす核酸の二次構造の影響

旋光度に及ぼす核酸の二次構造の影響を調べるため、λ-DNAとLAMP反応増幅産物を用い、熱変性前の二本鎖を形成している状態の時の旋光度と熱変性により一本鎖とし

た時の旋光度を測定した。すなわち、モノマー単位で0.4mMになるように調製したλ-DNA (48000bp) 及びLAMP反応増幅産物 (数100~数1000) について、95℃での5分間の熱処理を施す前と後の旋光度を 実施例1と同じ測定条件下で測定した。なお、前記熱処理後は各サンプルは氷上で急冷した。結果を表4に示した。表4から明らかのように、変性前の二本鎖DNAの方が、変性後の一本鎖DNAよりも旋光度が大きかった。このことより、増幅反応産物を熱変性させ、変性前後で旋光度が変化するか否かを指標として、核酸増幅産物を検出することができることが判明した。

【0046】

【表4】

サンプル	旋光度 α		熱変性による旋光度 α の変化率 (%)
	熱変性前	熱変性後	
λ-DNA	0.0135	0.0065	48
LAMP 産物	0.0100	0.0090	90

(表中) 熱変性による旋光度 α の変化率 (%) = 熱変性後の旋光度 α / 熱変性前の旋光度 α

【0047】

【発明の効果】本発明により、核酸増幅産物の新たな検出方法が提供される。本発明の方法によれば、反応系の旋光度を測定することにより増幅産物を検出することができるので、きわめて簡便である。また、旋光度は核酸

増幅産物の量と相関性があるので、本発明は増幅反応のモニタリングにも利用できる。

【0048】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

<120> METHOD OF DETECTING AMPLIFIED PRODUCTS OF GENE

<130> P00-0690

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
 <211> 178
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 tgcttggtgc ctctcgtggc agggcagtct gcggcgggtgt tctggtgcac cccagtgagg 60
 tcttcacagc tgcccactgc atcaggaaca aaagcgtgat cttgctgggt cggcacagcc 120
 tgtttcatcc tgaagacaca ggccaggat ttcaggtagc ccacagcttc acacaccc 178
 <210> 2
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA
 <400> 2
 tgttcctgat gcagtgaggc gcttagtct gcggcgggtgt tctg 44
 <210> 3
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA
 <400> 3
 tgctgggtcg gcacagcctg aagctgacct gaaatacctg gcctg 45
 <210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA
 <400> 4
 tgcttggtgc ctctcgtg 18
 <210> 5
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA
 <400> 5
 gggtgtgtga agctgtg 17
 <210> 6
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA
 <400> 6

aaaattcccc taattcgatg aggtcggcgc atagcatata aca

43

【 0 0 4 9 】

【配列表フリーテキスト】配列番号2：合成DNA

配列番号3：合成DNA

配列番号4：合成DNA

配列番号5：合成DNA

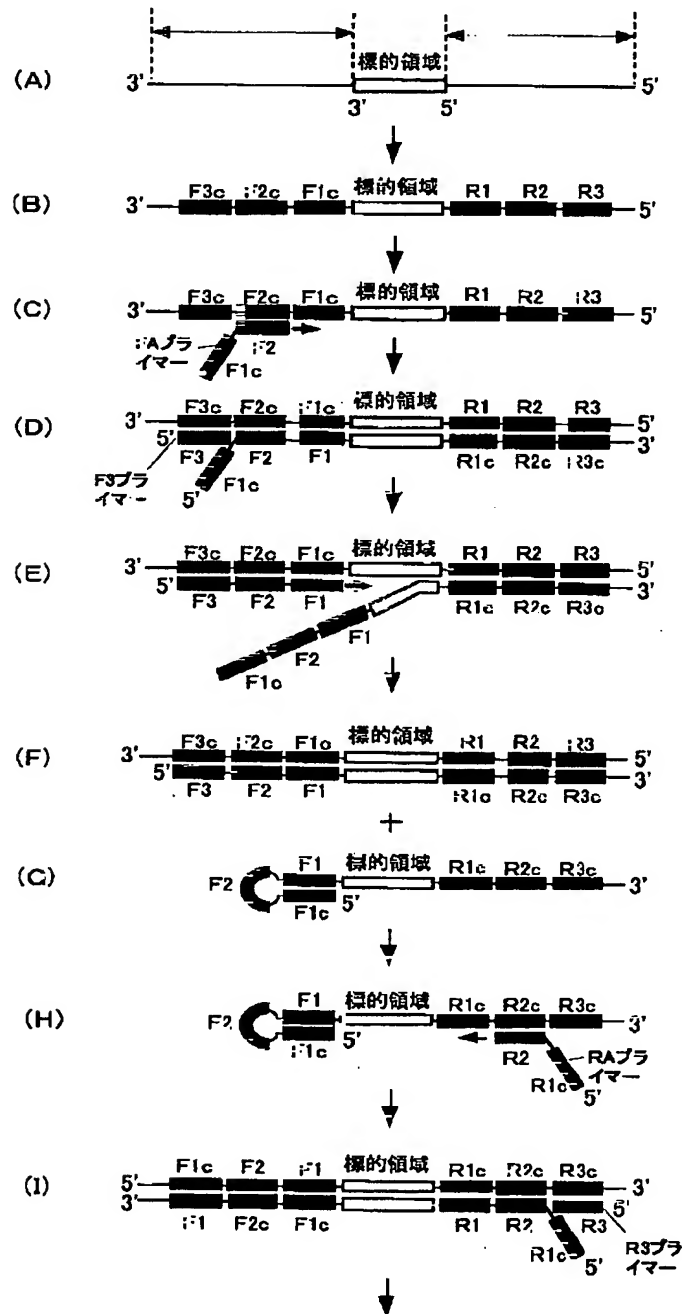
配列番号6：合成DNA

【図面の簡単な説明】

【図1】LAMP法による増幅方法の概要を示す図である。

【図2】LAMP法による増幅方法の概要を示す図である。

【図1】



【圖2】

